DE LA CAUSALITÉ DES TUMEURS CROWN - GALL

PAR

MICHEL GOEDERT

Introduction.

Le problème des tumeurs consiste dans l'étude des causes qui sont à la base de la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale. Le métabolisme de cette cellule tumorale pratique une synthèse accrue d'acides nucléiques, de protéines mitotiques et enzymatiques, ainsi que d'autres substances requises pour la croissance et la division cellulaires.

Une caractérisation des mécanismes cellulaires responsables de ces changements dans le métabolisme cellulaire semble donc indispensable pour une bonne compréhension du problème tumoral. Cela va être développé par la suite en utilisant comme modèle expérimental la maladie tumorale du crown-gall.

La maladie du crown-gall.

Le crown-gall présente un cas unique en cancérologie. C'est le seul cas où l'on assiste à une formation de tumeur à la suite de l'inoculation d'une bactérie. C'est le premier cancer produit expérimentalement.

Les tumeurs crown-gall sont produites par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (SMITH et TOWN) Conn. Ces tumeurs végétales présentent les mêmes changements morphologiques et biochimiques que les cancers animaux et humains. Les études sur l'induction tumorale par *A. tumefaciens* peuvent donc fournir de nouveaux aspects qui pourraient intéresser tous ceux qui se préoccupent du problème du cancer.

Nous avons divisé cette étude en 4 grandes étapes :

a) La phase de conditionnement;
b) Le rôle de la bactérie dans la transformation tumorale;
c) L'induction et le Principe Inducteur de la Tumeur;
d) Déduction d'un modèle expérimental de la causalité des tumeurs crown-gall.

La phase de conditionnement.

On désigne par conditionnement l'ensemble des processus par lesquels des cellules situées au voisinage d'une blessure deviennent sensibles à l'induction tumorale.

Dès les premières études sur le problème du crown-gall, on a constaté qu'une blessure est nécessaire à la transformation tumorale chez les végétaux. La fonction de la blessure n'est pas uniquement de mettre en contact une bactérie avec une cellule. C'est ainsi qu'on n'obtient pas de tumeur si on introduit la bactérie à l'intérieur de la cellule sans blessure préalable. Si on pratique en un point quelconque de la tige, au voisinage de la bactérie, des piqûres stériles, le phénomène de la tumorisation se déclenche.

S'il est possible de définir la phase de conditionnement avec une très grande précision dans le temps, il faut dire que ces phénomènes sont difficiles à observer à l'échelle cellulaire, puisqu'il s'agit d'un phénomène précédant toute mitose.

On sait que le traumatisme (dû à la blessure) ne perturbe pas le comportement normal des enzymes participant à l'accumulation ou à l'hydrolyse de l'amidon. Il est également établi que les cellules conditionnées contiennent dans la région péritraumatique des quantités importantes d'acide ribonucléique.

C'est pratiquement tout ce qu'on sait sur cette phase de conditionnement.

Le rôle de la bactérie.

Avant de parler du rôle joué par la bactérie dans le processus de cancérisation, nous avons étudié les propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques de huit souches d'*A. tumefaciens*.

A. tumefaciens est une bactérie appartenant à l'embranchement des *Schizomyctes* et au sous-embranchement I des

Eubacteria. Elle appartient à la classe I des asporulales Prévot 1948 et à l'ordre II des Bactériales Prévot 1940, ainsi qu'à la famille V des *Pseudomonadaceae*.

Pseudomonadaceae :

Pseudonomas
Phytobacterium
Agrobacterium
Xanthomas
Cellulomonas
Whitmorella
Erwinia
Aplanobacter

Pour cette étude et pour toutes celles qui suivent, nous avons utilisé les souches B6, A6 A66, II BNV6, S1, 5 Gly et 806 V. Ces souches proviennent de l'Institut Pasteur de Paris. La souche d'*E. coli* qui a parfois été utilisée comme témoin, provient du Laboratoire bactériologique de l'Etat de Luxembourg.

Avant de relater les résultats obtenus, nous voudrions esquisser brièvement les caractéristiques des différentes souches.

a) Les bactéries appartenant aux souches sauvages B6 et A6 possèdent la même virulence. Elles induisent des proliférations tumorales dont les pesées (am mg près) ne présentent pas de différences significatives (au niveau de 1%;

b) L'isolement de la souche A66 a été fait à partir de la souche A6 sans sélection évidente ce qui fait qu'elle a été qualifiée de mutant spontané à virulence atténue.

c) La souche 5 GlyFe a été obtenue à partir de la souche tumorigène A6. Sa croissance est inhibée par une solution contenant plus de 1 g/l de glycine. Cette souche est également qualifiée d'avirulente.

d) La souche II BV7 est virulente et il en a été isolé une souche avirulente spontanée II BNV6.

e) La souche S1 est une souche résistante à la streptomycine (200 mg/l). Elle est virulente.

f) Par irradiation ultraviolette on a obtenu la souche virulente 806 V.

Morphologie.

L'observation microscopique révèle qu'*A. tumefaciens* est une bactérie en forme de bâtonnet. En utilisant la méthode d'après RHODES, nous avons pu trouver qu'*A. tumefaciens* possède des cils polaires, tandis que toutes les souches se sont révélées être gram-négatif.

Propriétés physiologiques et biochimiques.

En utilisant la méthode classique, nous avons trouvé que les huit souches sont formées de bactéries aérobies. Grâce à la gélose molle, nous avons trouvé que les huit souches sont mobiles.

La température optimale de croissance d'A. tumefaciens est de 25 degrés Celsius. A 37 degrés et à la température caractéristique des Pseudomonas de 42 degrés Celsius, cette croissance est relativement bonne.

Les bactéries appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* produisent habituellement les deux pigments pyocyanine et pyoverdine. A l'aide des milieux nutritifs spéciaux d'après KING, WARD et RANEY, nous n'avons pas trouvé les colorations caractéristiques (même pas sous lumière de WOOD). Un test supplémentaire qui examinait la présence de pyocyanine a également donné des résultats négatifs.

A. tumefaciens produit de l'indole, il y a hémolyse des hématies. Toutes les souches (excepté A6 et A66) liquéfient la gélatine, tandis que les huit souches produisent du H_2S (acide sulfhydrique).

Les tests recherchant la présence de lysine décarboxylase et de phénylalanine désaminase ont donné des résultats négatifs, le test de l'acétyméthylcarbinal (test de Voges-Proskauer) a donné des résultats positifs.

La recherche de l'oxydase d'après KOVACS a donné des résultats entièrement négatifs, tandis que les souches II BV7 et 5 Gly ont donné une réponse positive au test qui cherchait à mettre en évidence la présence de cytochromeoxydase. Le test de l'uréase sur milieu de CHRISTENSEN a donné une réponse positive (excepté pour A6 et A66).

Les huit souches fermentent les hydrates de carbone, tels les xylose, glucose, saccharose, lactose, raffinose, mannitol et

amidon soluble; le test du citrate comme unique source de carbone a donné des résultats négatifs. Cela a été établi grâce au milieu de HUGH et LEIFSON.

Pour finir, nous avons cherché sur quel milieu nutritif (parmi les 12 utilisés) la croissance des huit souches est la meilleure.

Les milieux utilisés furent le milieu de gélose nutritive normale et enrichie au peptone, le milieu Muller-Hinton, le Merck I-Standard-Nähragar, le Merck II-Standard-Nähragar, le milieu à l'esculine et celui au bromcrésol, le milieu Salmonella/Shigella, le milieu à la tellurite et celui au sang (contient 12,5% de sang de cheval).

La croissance est la meilleure sur les milieux suivants :

B6	Merck II et peptone
A6	Bonne (excepté pour Salmonella/Shigella, tellurite, Merck I et II)
A66	Merck I et II
II BNV6	Muller-Hinton
II BV7	Esculine et Bromcrésol
S1	Bromcrésol
5 G1y	Bonne (excepté Salmonella/Shigella et tellurite)
806 V	Bonne (excepté Salmonella/Shigella et tellurite)

Quelle est maintenant la part de la bactérie dans le processus de cancérisation? On sait que les tumeurs secondaires en sont dépourvues et que les tumeurs primaires n'en contiennent que très peu. On pourrait donc minimiser ce rôle, mais tous les essais faits pour inoculer des bactéries lésées ont échoué. Les broyages et l'action des agents physiques dans des conditions qui ne respectent pas l'intégrité du germe se sont tous révélés être inefficaces. Il faut sans doute rapprocher de ces faits l'emploi des antibiotiques en agriculture pour traiter les tumeurs crown-gall.

Ceci nous amène à considérer l'action de divers antibiotiques et sulfamides sur les huit souches de la bactérie *A. tumefaciens*. Nous avons effectué un certain nombre d'expériences relatives à ces substances.

Dans une première étape, nous avons déterminé des Concentrations Minimales Inhibitrices (C. M. I.) de dix-sept antibiotiques et d'un sulfamide sur les huit souches d'*A. tumefaciens*. Les concentrations s'échelonnaient entre 62,5 et 0,03 mcg. La méthode utilisée fut la méthode classique; elle consiste à verser l'antibiotique dans le milieu nutritif, à l'ensemencer et à incuber pendant 24 heures à 37 degrés Celsius. Les résultats peuvent alors facilement être lus. Pour faciliter les comparaisons, nous avons exprimé les résultats en Unités Statistiques (U. S.) selon la formule: Unité Statistique $= 10 \times \log$ (C. M. I. $\times$ 100), simplifié à deux chiffres en négligeant les décimales.

Ces résultats qualitatifs peuvent être utiles à quiconque veut combattre efficacement *A. tumefaciens* par des antibiotiques et des sulfamides. Nous avons obtenu des résultats quantitatifs en utilisant les disques de sensibilité d'après la méthode classique des antibiogrammes.

Le nombre de bactéries est déterminé en comptant les colonies présentes après dilution préalable et inoculation convenable.

Nous avons pu ainsi trouver que la streptomycine, la métacycline, la doxycycline, la sigmamycine et le T. A. O. sont indiqués à de faibles concentrations contre les huit souches d'*A. tumefaciens*. Les antibiotiques restants, à savoir le penbritin, l'érithromycine, la virginiamycine, le cambiotic, le thiamphénicol, la tétracycline, la terramycine, la furadantine, le furoxon, la rifampicine et la rifocine ne sont pas indiqués à de faibles concentrations. Leur action ne s'étend qu'entre 15,8 et 62,5 mcg. Le sulfamide utilisé, le sulfaméthoxazol, ne s'est pas révélé être très efficace.

Les antibiogrammes ont confirmé les résultats précédents aux concentrations utilisées. La colymycine et la fucidine sont assez efficaces.

Dans une deuxième étape, nous avons examiné l'action de la pénicilline et de la streptomycine sur les tumeurs. Comme souche nous avons choisi B6, parce qu'elle nous a semblé être la plus représentative

Comme matériel végétal, nous avons utilisé des plantes de tomate (âgées approximativement de trois mois). Elles ont

été blessées à l'aide d'un petit trocart. Ce dernier permet de pratiquer des blessures d'une égale profondeur. Avec la méthode de KLEIN et de MANIGAULT, nous avons pu obtenir des tumeurs exemptes de bactéries.

Ces tumeurs ont été traitées avec une dose de penbritin de 31,25 mcg. Cette concentration ne permet plus la croissance d'*A. tumefaciens*. Un deuxième lot a été traité avec 0,976 mcg de streptomycine. Cette concentration empêche également la croissance de la souche B6.

Dans le cas du penbritin, nous avons assisté à une nette régression des tumeurs; elles s'estompent et finissent par disparaître. Pour la streptomycine, il n'y a pas de régression notable. Nous pouvons donc conclure que le penbritin agit aussi bien sur la tumeur que sur la bactérie, alors que la streptomycine atteint uniquement la bactérie.

L'action d'un antibiotique ou d'un sulfamide sur la tumeur et sur la bactérie n'est donc pas identique. Il s'agit bien de distinguer entre les deux.

Une étude relative aux substances requises pour permettre la croissance d'*A. tumefaciens* s'est révélée superflue. Nous avons en effet trouvé qu'*A. tumefaciens* croît relativement bien sur un milieu minimal.

L'induction et le principe inducteur de la tumeur (P. I. T.).

L'induction est caractérisée par la présence de la bactérie. C'est le seul moment où l'action de la bactérie s'exerce directement sur les cellules qui viennent d'être conditionnées par la blessure; c'est pendant ce temps que s'établit dans le complexe hôte-bactérie un Principe Inducteur de la Tumeur (P. I. T.) qui va rendre tumorale la cellule conditionnée.

BRAUN a trouvé que le temps nécessaire à la synthèse du P. I. T. est de 10 heures à 25 degrés Celsius. GAUTHERET a trouvé que la souche avirulente A66 produit des tumeurs lors d'une application exogène de l'hormone de croissance auxine. Une application agissant uniquement sur la bactérie ne produit pas de tumeurs.

Le rôle joué par la bactérie semble donc être relativement ambigu. Il nous a semblé intéressant par conséquent d'étudier

si l'auxine agit sur la croissance de la bactérie. Nous avons utilisé, aussi bien de l'auxine naturelle, que de l'auxine synthétique. Nous avons étudié en plus l'action de la substance précédant l'auxine dans le métabolisme cellulaire. Il s'agit de l'acide aminé tryptophane (L-Try).

Les concentrations utilisées furent de 0,1; 0,2 et 0,5%. Nous avons trouvé que les trois substances examinées n'ont pratiquement aucune influence sur la croissance des huit souches d'*A. tumefaciens*.

Différentes expériences ont montré que des rayons ultraviolets et l'antibiotique mitomycine C augmentent la virulence d'*A. tumefaciens*.

Nous avons étudié l'influence de la mitomycine C sur la croissance d'*A. tumefaciens*. Les concentrations minimales inhibitrices et la croissance à des concentrations de 0,1! 0,2 et 0,5% ont permis de montrer qu'il faut considérer la mitomycine C comme une substance antimitotique relativement forte.

Nous sommes d'avis que cette virulence accrue est due au fait que certaines bactéries deviennent résistantes conte la mitomycine C. Ces bactéries seraient alors plus virulentes que les bactéries normales.

Le thiouracile est une autre substance antimitotique. DANIL et FOURNEAU ont montré que cette substance entrave considérablement le processus de cancérisation. Nous avons trouvé que cette substance ne permet aucune croissance d'*A. tumefaciens* aux concentrations de 0,1; 0,2 et 0,5%.

L'acide borique (H_3BO_3) semble être une autre substance antimitotique. D'après STONIER, le bore est indispensable à de faibles concentrations pour des tissus normaux et cancérigènes. A des concentrations plus élevées, il s'agit d'un poison mitotique. Nous avons étudié l'action de l'acide borique sur la croissance d'*A. tumefaciens*.

Nous avons d'abord examiné l'action de l'acide borique (0,5%) sur la croissance de racines d'oignon. Le résultat en fut que les oignons traités à l'acide borique avaient des racines beaucoup moins longues que ceux traités normalement. La croissance d'*A. tumefaciens* est également fortement entravée par l'acide borique (0,1; 0,2 et 0,5%).

Une publication récente mentionne le fait que des sarcomes de Rous traités avec une solution de vitamine A à 20% ont un poids beaucoup plus important que ceux normalement traités (sarcomes normaux: 4—6 g; sarcomes avec Vit. A: 4—50 g).

Nous avons étudié l'action de la vitamine A acétate et palmitate sur la croissance d'*A. tumefaciens*. Les résultats indiquent clairement que la croissance de toutes les souches d'*A. tumefaciens* est de loin meilleure sur un milieu enrichi à la vitamine A (20%) que sur un milieu nutritif normal. Une étude future devra déterminer si tel est aussi le cas pour les tumeurs.

Puisqu'on ne connaît pratiquement rien sur la structure du Principe Inducteur de la Tumeur (P. I. T.), il nous a semblé intéressant d'étudier si ce P. I. T. a quelque chose à avoir avec les acides nucléiques, acide Désoxy- et acide ribonucléique.

Pour cela, nous avons utilisé les enzymes ribonucléase et désorxyribonucléase. Comme leur nom l'indique, ces enzymes hydrolysent les deux acides nucléiques. Comme souche bactérienne, nous avons de nouveau utilisé la souche virulente B6 et comme matériel végétal cinq lots à 20 plantes de tomate (âgées approximativement de trois mois).

Les blessures ont de nouveau été effectuées à l'aide d'un petit trocard. Nous avons effectué trois blessures par plante. Les plantes blessées ont été maintenues pendant 30 heures à 25 degrés Celsius pour rendre possible le conditionnement. Après, nous leur avons appliqué les solutions d'enzymes (5 mg/1 et 0,1 mg/1), maintenues par des morceaux d'ouate à poids uniforme et à volume de solution également uniforme. Les morceaux d'ouate des plantes non traitées furent imprégnés d'eau distillée stérile.

Après un court intervalle de temps, les bactéries furent inoculées (volume 0,01 ml). On laisse les plantes ensuite pendant 30 heures à une température qui ne doit pas dépasser 25 degrés Celsius (à cause du P. I. T.). On laisse ensuite les cinq lots (2 ribonucléase; 2 désoxyribonucléase; 1 lot témoin) pendant 4 semaines à la température de chambre en veillant à des conditions de température et d'humidité constantes.

Au bout d'un mois, les plantes traitées à la ribonucléase (5 mg/1) n'avaient pas développé de tumeurs. A 0,1 mg/1, on

a observé des différences de poids très importantes avec les tumeurs des plantes normales.

Au bout d'un mois, les plantes traitées à la désoxyribonucléase (5 mg/1 et 0,1 mg/1) n'avaient pas développé de tumeur.

Dans une deuxième étape, nous avons étudié l'action de la ribonucléase sur la blessure des plantes. Nous avons trouvé qu'elle n'empêche aucunement une cicatrisation normale. D'autre part, BRAUN et WOOD ont trouvé que les tissus végétaux ne réagissent pas sur une application de ribonucléase.

Dans une troisième étape, nous avons étudié l'action de la ribonucléase sur la croissance d'*A. tumefaciens*. Pour cela, nous avons utilisé la méthode classique du comptage des colonies après dilution convenable.

Nous avons trouvé qu'aux concentrations précédemment utilisées (5 mg/1 et 0,1 mg/1), il n'y a pas de régression notable de la croissance.

Nous pouvons donc conclure que la structure du P.I.T. ou, du moins, d'un composé essentiel à sa synthèse, est étroitement liée à la structure d'un ARN. D'autre part, la ribonucléase n'agit, ni sur la croissance de la plante, ni sur la blessure, ni sur la bactérie.

On peut donc admettre que si la ribonucléase entre, soit dans la bactérie, soit dans la cellule végétale ou dans les deux à la fois, elle bloque la synthèse d'une substance indispensable à l'induction tumorale sans toutefois gêner la faculté de la cellule à se développer normalement (croissance et division).

Déduction d'un modèle expérimental de la causalite des tumeurs crown-gall.

Le problème des tumeurs en général, et des tumeurs crown-gall en particulier, réside dans le fait qu'il faut arriver à comprendre comment une cellule normale se transforme en cellule cancéreuse; il faut donc comprendre le mécanisme qui est à la base de la transformation maligne.

Dans le cas des tumeurs crown-gall, il est démontré qu'une blessure préalable est indispensable à une infection avec *A. tumefaciens*. Le rôle de cette blessure a été précisé par RIEMANN.

Notre modèle expérimental porte sur les phénomènes qui se déroulent au niveau cellulaire après une infection avec *A. tumefaciens*.

Comme nous venons de le voir plus haut, une infection efficace présuppose une blessure préalable. Il a été récemment démontré que cette infection est suivie de l'inclusion de l'ADN bactérien dans la cellule végétale. Il faut mentionner ici le rôle des phages qu'on a isolés à partir de ces différentes souches. On peut effectivement trouver ces phages dans les plaies d'inoculation de la 10e à la 28e heure après l'infection, c'est-à-dire au moment où commence la transformation maligne. Il semble que l'ADN de ces phages purs provoque des proliférations analogues au crown-gall. Il est toutefois également prouvé que les bactéries curées de leurs phages sont encore virulentes. Il semble donc qu'un fragment d'ADN de la bactérie pénètre dans la cellule et entraîne avec lui le phage. Cette hypothèse confirme d'ailleurs les résultats expérimentaux rapportés plus haut.

L'infection avec *A. tumefaciens* est donc suivie de l'inclusion de l'ADN bactérien dans la cellule végétale. Ceci a pour conséquence l'élaboration continuelle du Principe Inducteur de la Tumeur (P. I. T.), dont la structure est, comme nous venons de le voir, intimement liée à celle d'un ARN.

Ce P. I. T. élabore alors un facteur de division cellulaire (« cell division factor »). L'existence de ce facteur a été récemment démontrée par WOOD, LIN et BRAUN.

Ce facteur est un inhibiteur de l'enzyme adénosine monophosphate (AMP) phosphodiestérase. Cette enzyme catalyse la transformation de l'AMP 3'5' cyclique en AMP 5', en hydrolysant l'ester 3'.

AMP 3'5' cyclique + H_2O *phosphod.* AMP 5'

Elle inactive ainsi l'AMP cyclique en le transformant en une forme inerte d'AMP et agit donc en tant que régulateur de l'AMP cyclique à l'intérieur de la cellule. Il faut remarquer que ce facteur de division cellulaire s'est révélé être aussi efficace sur de la phosphodiestérase provenant de l'encéphale de bovin que sur une solution de l'enzyme isolée des tissus tumoraux du crown-gall.

D'autre part WOOD et al. ont trouvé que l'enzyme adénylcyclase qui catalyse la synthèse de l'AMP cyclique à partir de l'adénosine triphosphate (ATP), est une componente étroitement liée à la structure membranaire des tissus tumoreux.

ATP *adénylcycl.* AMP 3'5' cyclique + P-O-P

Vu que le facteur de division cellulaire inhibe la synthèse de l'AMP phosphodiestérase, nous nous trouvons en face de quantités d'AMP cyclique anormalement élevées. Les cellules tumorales contiennent donc plus d'AMP cyclique que n'en contiennent les cellules normales.

, Chaque cellule est entourée d'une membrane périphérique très mince, dont l'épaisseur est de l'ordre de 10—6 cm.

Bien qu'il en existe d'autres, le modèle de DANIELLI-ROBERTSON est celui qui est le plus souvent cité. Les membranes sont formées de lipides et de protéines. Les lipides sont formés d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile. Ces molécules sont ordonnées. Il y a double couche lipidique, les zones hydrophobes sont juxtaposées, les zones hydrophiles sont tournées vers une couche protéique externe et une couche protéique interne.

Cette membrane ne joue pas seulement un rôle de protection, mais intervient également dans la pénétration de différentes substances dans l'intérieur de la cellule.

Lorsque le transport à travers une membrane se fait selon un processus physique, on parle de transport passif. Si le transport met en jeu des facteurs biologiques membranaires : transfert d'énergie, catalyse enzymatique, on a affaire à un transport actif. Les systèmes actifs de transport membranaire répondent à un certain nombre de lois:

La protéine de transport fixe spécifiquement la substance après l'avoir reconnue. Elle subit un mouvement ou translocation qui amène la substance à l'intérieur de la cellule, elle libère la substance et subit de nouveau une translocation qui lui permet de fixer une nouvelle substance du milieu extérieur. Une de ces étapes consomme de l'énergie sous forme d'ATP.

A l'intérieur de la cellule normale, il existe un certain équilibre entre le phénomène passif de perméation des ions et entre le transport actif des ions en vue de maintenir un poten-

tiel membranaire constant. Ce qui distingue le transport actif du transport passif est la consommation d'ATP.

Dans le cas des tumeurs crown-gall, l'enzyme adénylcyclase qui catalyse la transformation de l'AMP cyclique à partir de l'AMP a été trouvé comme étant une componente étroitement liée à la structure membranaire des tissus tumoraux, alors que la synthèse de l'enzyme AMP phosphodiestérise est inhibée par le facteur de division cellulaire.

Ce dernier fait a pour conséquence une quantité accrue d'AMP cyclique. Si nous avons une quantité accrue d'AMP, cyclique, il nous faut également une quantité accrue d'ATP, parce que l'AMP cyclique est formé à partir de l'ATP. Si beaucoup d'ATP est utilisé dans la membrane cellulaire pour permettre la synthèse accrue d'AMP cyclique, il y a forcément moins d'ATP qu'il n'en faudrait pour permettre un transport actif normal à travers la membrane.

Ceci implique que l'équilibre existant entre les transports actif et passif est rompu à l'avantage de ce dernier. Si l'importance du transport passif est augmentée dans les tissus tumoraux, cela entraîne que la perméabilité membranaire de ces tissus doit être plus élevée que celle des tissus normaux.

Une telle étude de perméabilité membranaire consiste à mesurer l'absorption par les cellules normales et les cellules tumorales d'un anion et d'un cation.

On cultive les cellules normales et tumorales sur un milieu synthétique auquel on incorpore des anions et des cations radioactifs. Au bout de deux semaines, on brûle les tissus normaux et tumoraux et on mesure à l'aide d'un compteur à scintillation la quantité de rayonnements émis.

WOOD a trouvé que les cellules tumorales absorbent deux fois plus d'ions que n'en absorbent les cellules normales. Ceci est vrai, aussi bien pour des anions que pour des cations. Ces résultats semblent donc confirmer les thèses que nous avons énoncées plus haut.

Tout ceci montre donc qu'une augmentation de la perméabilité cellulaire accompagne la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale. Cette perméabilité cellulaire permet la pénétration d'ions spécifiques qui doivent activer cer-

tains systèmes biosynthétiques indispensables aux divisions cellulaires.

Nous pensons que les histones constituent ces systèmes biosynthétiques. Les histones sont des protéines comportant un nombre élevé de groupements acides aminés particuliers, généralement basiques, capables de se fixer sur les acides nucléiques. Les histones jouent un rôle dans la répression de la transcription de l'ADN. Les fractions d'histones se trouvent vraisemblablement spécifiquement liées à la double-hélice d'ADN spécifique des histones. Une transcription ne peut avoir lieu que si les protéines basiques se libèrent partiellement de l'ADN.

Les histones réagissent d'une façon très sensible à l'application d'ions. Ils transforment leur structure quaternaire lors de l'application de ces ions. Dans ce cas, il y a un changement entre la liaison de l'histone et celle de l'ARN spécifique de cet histone. La structure quaternaire optimale de l'histone n'est plus garantie. Il y a séparation partielle de la liaison de l'ADN avec l'histone. Une concentration ionique déterminée est donc requise pour permettre cette séparation partielle entre l'ADN et l'histone. KROEGER et LEZZI ont effectivement trouvé une concentration ionique spécifique des tumeurs du crown-gall.

Cette séparation partielle a pour conséquence une diminution de la répression de la transcription de l'ADN. Il s'ensuit un nombre plus élevé de divisions cellulaires, indispensables au processus de la tuméfaction.

La croissance anarchique des cellules s'explique donc par une diminution de la répression de la transcription de l'ADN par les histones. Les tumeurs sont la conséquence de cette croissance cellulaire anarchique.

Reste le problème de la quantité d'hormones nécessaires à ce nombre très élevé de divisions cellulaires. Des publications récentes indiquent clairement que le rôle joué par l'AMP cyclique dans le métabolisme hormonal est sensiblement le même chez les plantes que chez les animaux.

S'il y a un nombre élevé de divisions cellulaires, une quantité élevée d'hormones de croissance est nécessaire. Si une quantité importante d'hormones de croissance est nécessaire, une quantité importante d'adénylcyclase est nécessaire pour

la transformation de l'ATP en AMP cyclique. C'est en effet cet AMP cyclique qui déclenche les réactions intracellulaires, spécifiques des hormones.

Ces résultats confirment notre modèle expérimental. Dans le cas des tumeurs crown-gall, nous sommes en effet en présence d'une quantité importante d'AMP cyclique, due à l'action du facteur de division cellulaire. Ceci entraîne qu'une quantité d'hormones est mobilisée. Cette quantité importante fournit les moyens nécessaires au nombre de divisions cellulaires accrues, phénomène caractéristique de la transformation tumorale, due à une répression moins importante de la transcription de l'ADN chez les cellules tumorales que chez les cellules normales.

TABLEAU — RÉSUMÉ

Blessure

Infection

Inclusion de l'ADN bactérien dans la cellule végétale

Elaboration continuelle du P. I. T.

Le P. I. T. fabrique le facteur de division cellulaire
(« Cell Division Factor »)

Ce facteur favorise la formation de l'AMP cyclique
indispensable à l'efficacité des hormones nécessaires
à la division et à la croissance cellulaires

Ce facteur gêne l'élaboration d'ATP

L'équilibre membranaire entre les transports actif et passif est rompu

Le phénomène passif de perméation des ions surplombe de phénomène actif du transport des ions

La perméabilité membranaire devient sensiblement plus élevée

Il y a une pénétration plus grande d'ions spécifiques à l'intérieur des cellules

Cette pénétration entraîne un changement dans la structure quaternaires des histones

Il y a séparation partielle entre l'histone
et la double-hélice d'ADN

La répression de la transcription de l'ADN
par les histones est diminuée

Il y a un nombre de transcription considérablement augmenté

Il y a une augmentation des divisions cellulaires

Cela entraîne une croissance anarchique des cellules

Tumeur

Conclusions

L'étude des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques de la bactérie du crown-gall, *A. tumefaciens,* peuvent servir celui qui veut identifier la bactérie. L'identification des différentes souches est cependant assez mal aisée, vu l'étroite parenté existant entre ces souches. Pour cela, il faudrait déterminer le taux d'agglutination du sérum de lapin anti-différentes souches. Une remarque s'impose toutefois en ce qui concerne la pigmentation. Il est généralement admis que la production de pigment par les bactéries est un phénomène variable; *A. tumefaciens* n'échappe pas à cette règle. Les résultats de la pigmentation sont donc à considérer sous certaines réserves.

La détermination des C. M. I. pour différents antibiotiques a permis de fournir des résultats qualitatifs précis (sauf pour les C. M. I. situées au-dessus ou en-dessous des séries de dilution utilisées). L'étude des antibiogrammes n'a pu donner que des résultats d'une valeur quantitative. Il est intéressant de constater que l'action des antibiotiques sur la bactérie et sur la tumeur n'est pas identique. Il faudrait étendre cette étude à d'autres antibiotiques.

A. tumefaciens est une bactérie capable de synthétiser les substances nutritives nécessaires à sa croissance. Les auxines naturelle et synthétique, ainsi que le tryptophane, n'ont aucune influence sur la croissance de la bactérie *A. tumefaciens.*

L'étude de l'action d'une ribonucléase et d'une désoxyribonucléase a montré que la structure de P. I. T. est étroitement liée à celle d'un ARN. On ne peut tout de même pas en

dire plus. Pour cela, il faudrait isoler le P.I.T. et déterminer sa structure exacte.

La mitomycine C et le thiouracile se sont révélés être des substances antimitotiques très fortes. La virulence accrue en présence de la mitomycine C nous semble être due aux bactéries devenues résistantes à l'antibiotique. Une étude approfondie devra déterminer si tel est le cas et si on peut étendre cette conclusion au thiouracile. L'action antimitotique prophasique de l'acide borique a été confirmée (par une étude de son action sur la croissance d'*A. tumefaciens),* tandis que la vitamine A favorise la croissance de la bactérie *A. tumefaciens*. Là encore, une étude de l'action des deux substances sur les tumeurs crown-gall serait intéressante.

Nous espérons que notre modèle expérimental aura contribué tant soit peu à une meilleure compréhension de la transformation maligne. Une étude future devra déterminer si les thèses émises quant à l'action des histones sont exactes. Nous pouvons dire avec certitude, et cela a été expérimentalement démontré, qu'il existe une relation établie entre l'action de la bactérie *A. tumefaciens* et une perméabilité membranaire accrue. Le P. I. T., le facteur de division cellulaire et les enzymes AMP phosphodiestérase et adéylcyclase jouent un rôle décisif dans l'apparition de cette perméabilité membranaire accrue.

En définitive, nous espérons avoir apporté quelques précisions en ce qui concerne le problème des changements dans le métabolisme cellulaire des tumeurs crown-gall.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Professeur Pierre Manigault (Chef de Service à l'Inst. Pasteur, Paris) et le Docteur Eugène Ost (Chef de Service à l'Inst. d'Hygiène, Luxembourg) qui nous ont aimablement fourni les souches utilisées.

Nous exprimons toute notre gratitude au Dr. Fernand Schwachtgen (Directeur de l'Inst. d'Hygiène) et au Dr. Arsène Betz (Chef de Service à l'Inst. d'Hygiène).

Nous adressons nos sincères remerciements à M. Joseph Heinen (Directeur de l'Athénée, Luxembourg), à M. Joseph Poeker (Directeur-adjoint de l'Athénée) et à MM. Norbert

Schroeder et Léon Schandel (Professeurs de biologie à l'Athénée).

Nous remercions MM. Norbert Klees et Claude Muller pour leur bonne collaboration.

Nos remerciements vont également à M. François Arendt (Chef de Service à l'Inst. d'Hygiène), au Dr. Suzette Bové (pédiatre), à M. Fohl (Concierge de l'Athénée), au Dr. Roger Fromes (Chirurgien), à MM. Emile Gérard (Professeur de chimie à l'Athénée) et Jean-Baptiste Hoffmann (Appariteur à l'Athénée), au Dr. Camille Kioes (Radiologue), au Dr. Adolphe Kohn (Chef de Service au Laboratoire Vétérinaire, Luxembourg), à M. Albert Lambert (Professeur de chimie à l'Athénée), au Dr. François Schneider (Inst. d'Hygiène) et à MM. Robert Wennig (Professeur aux Cours Universitaires, Luxembourg) et René Weiss (Professeur-administrateur des Cours Universitaires).